

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

② Patentschrift
⑩ DE 44 04 625 C 2

⑤ Int. Cl.⁸:
C 12 N 7/06
A 61 L 2/00

②① Aktenzeichen: P 44 04 625.1-41
②② Anmeldetag: 14. 2. 94
④③ Offenlegungstag: —
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 13. 4. 95
④⑥ Veröffentlichungstag
des geänderten Patents: 17. 10. 96

Patentschrift nach Einspruchsverfahren geändert

⑦③ Patentinhaber:
Baumgartner, Ludwig, Dr., 90425 Nürnberg, DE

⑦② Erfinder:
gleich Patentinhaber

⑤⑧ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

US	44 90 361
US	44 90 381
EP	02 12 040 A1
EP	3 24 729
EP	2 12 040
EP	1 59 311
EP	91 821
EP	36 415

⑤④ Verfahren zur Inaktivierung thermolabiler Viren in biologischem Material unter Beibehaltung der kollagenen Eigenschaften

⑤⑦ Verfahren zur Thermoinaktivierung thermolabiler Viren in kollagenen oder kollagenhaltigen Geweben, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebe in nicht wäßrigen Flüssigkeiten, Dämpfen oder Gasen einer Behandlung bei erhöhter Temperatur, die über der jeweiligen Inaktivierungstemperatur der Viren liegt, ausgesetzt werden unter Beibehaltung ihrer Transplantat-Eigenschaften.

DE 44 04 625 C 2

DE 44 04 625 C 2

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5 und der Verwendung thermobehandelter Gewebe nach Anspruch 6.

Bei der Herstellung von Transplantatkonserven humanen Ursprungs zur Anwendung in der Medizin hat z. B. insbesondere die HIV-Problematik einen hohen Stellenwert.

Serologische Tests auf HIV-Antikörper geben keine absolute Sicherheit auf HIV-Abwesenheit beim Spender; deshalb sind bei der Herstellung von Transplantatkonserven zur Virus-Inaktivierung zusätzliche Prozeß-Schritte erforderlich.

Bekannt ist hierzu eine chemische Behandlung mittels Wasserstoffperoxyd. Dieses Verfahren eignet sich jedoch vorzugsweise nur für dünnes, flächiges Material, ist aber bei kompakten Materialien (Knochen, Sehnen) wegen ungenügender Penetration des Agens wenig geeignet.

Den Nachteil ungenügender Penetration und damit ungenügender Inaktivierung von Viren in Knochenmaterialien sollten deshalb thermische Verfahren beseitigen können, da bekanntlich eine HIV-Inaktivierung bei einer Temperatur von 56°C erfolgt.

So ist ein Verfahren zur thermischen Inaktivierung von HIV in humanen Knochen in wäßrigem Medium bei einer Temperatur von 80°C und einer Behandlungsdauer von ca. 10 Min. bekannt (Unfallchirurg 18/92, 1—6 Nr. 1). Dieses Verfahren hat jedoch den Nachteil, daß die kollagene Matrix bei der angewendeten Temperatur denaturiert, so daß die osteoinduktiven Eigenschaften, die für ein Knochenersatzmaterial unerlässlich sind, verlorengehen oder zumindest stark reduziert sind. Auch können bei einer Behandlung von 80°C zwar HIV inaktiviert werden, nicht jedoch die erst bei 105°C thermolabilen Hepatitis-Viren B und C.

Es ist auch ein Verfahren aus der EP 01 41 004 B1 bekannt, bei dem Knochenersatz-Material durch Thermo-Sintern von nativen Knochen hergestellt wird. Hierbei wird sämtliches organisches Material verbrannt, darunter ev. vorhandene Viren, aber auch die kollagene Matrix. Ein auf diese Weise hergestelltes Knochenersatz-Material besitzt keine osteoinduktiven Eigenschaften mehr und ist somit für Transplantationszwecke ungeeignet.

Es ist ferner ein Inaktivierungsverfahren bekannt, welches Knochenmaterial mit gespanntem Wasserdampf behandelt. Dieses Verfahren arbeitet z. B. 10 Min. bei 121°C und inaktiviert sowohl HIV wie auch Hepatitis-Viren, schädigt gleichzeitig aber auch die kollagene Matrix wie auch das mineralische Knochengerüst selbst empfindlich. Ein so autoklaviertes Knochentransplantat hat deshalb keine osteoinduktiven Eigenschaften und ist somit als Knochenersatzmaterial völlig ungeeignet.

Aus der US 44 90 361 ist eine Virus-Inaktivierung durch Hitzebehandlung mittels organischer Flüssigkeit bekannt, die sich jedoch ausschließlich auf Blutplasma-Fractionen bezieht, wobei das pulverisierte Lyophilisat in Form einer Suspension hitzebehandelt wird.

Die EP 0 212 040 A1 beschreibt ein Verfahren zur Hitze-Inaktivierung von Viren, jedoch nur für die Faktor VIII-Präparation, wobei die Hitzebehandlung an einem Lyophilisat in trockenem Zustand bei Anwesenheit eines Schutzgases oder unter Vakuum erfolgt.

Ziel der Erfindung ist daher ein Verfahren, welches die Nachteile der aufgeführten chemischen bzw. thermischen Verfahren vermeidet.

Überraschend wurde erfindungsgemäß gefunden, das die schonende Herstellung eines biologischen Ersatzmaterials für Transplantationszwecke erlaubt, wobei sowohl eine Inaktivierung thermolabiler Viren (wie HIV und Hepatitis) erfolgt, als auch die erforderlichen Eigenschaften der kollagenen oder kollagenhaltigen Gewebe weitestgehend erhalten bleiben.

Nach diesem Verfahren wird das biologische Material (z. B. Dura mater, Faszia lata, Faszia temporalis, Sehnen, Gefäße, Amnion, Haut, Knorpel, Knochen sowie andere kollagene Gewebe) einer thermischen Behandlung oberhalb der Inaktivierungstemperatur von Viren ausgesetzt, wobei die Wärmeübertragung mittels wasserfreien bzw. fast wasserfreien (bis zu etwa 10% Wasseranteil) Flüssigkeiten, Dämpfen oder Gasen erfolgt. Dabei kann der Prozeß der Wärmeübertragung bei Normaldruck oder bei vermindertem Druck oder bei erhöhtem Druck oder alternierend erfolgen. Zur Erzielung der gewünschten Wärmeübertragung können auch Gemische von geeigneten Flüssigkeiten, z. B. auch azeotrope Gemische, verwendet werden.

Geeignete Flüssigkeiten sind: Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol, Isobutanol, Aceton, Methyläthylketon, Glykol, Glycerin, Propandiol, Heptan, Isoheptan, Dimethylsulfoxyd, Polyethylenglycol, Silikonöl, 2,3-Butandiol.

Geeignete Gase: N₂, CO₂, Edelgase.

Folgender Versuch belegt die Wirksamkeit des Verfahrens am Beispiel des Schrumpfungsverhaltens eines kollagenen Gewebes bei Thermobehandlung in einer wasserfreien Flüssigkeit (z. B. IPA) im Vergleich zu gleicher Behandlung in einer wäßrigen Flüssigkeit (z. B. Wasser). Dura mater-Streifen von 4 mm Breite und 60 mm Länge werden in einem IPA-Bad 20 Min. bei 80°C behandelt:

Es tritt keine Schrumpfung des Gewebes ein. Ein gleicher Streifen unter gleichen Bedingungen in einem Wasserbad behandelt, verkürzt sich innerhalb von Sekunden auf etwa 50% seiner ursprünglichen Länge.

Ganz offensichtlich werden die Strukturen des kollagenen Moleküls und der Fibrillen durch die Thermobehandlung in wäßrigem Medium irreversibel geschädigt, wogegen in nicht wäßrigem Medium keine Beeinträchtigung eintritt.

Die Intaktheit des Kollagengewebes ist aber Voraussetzung für die Eignung als chirurgische Transplantationsmaterial. Es ist einleuchtend, daß z. B. ein Duragewebe, welches durch eine Thermobehandlung in wäßrigem Medium eine irreversible Schädigung infolge der Schrumpfung erlitten hat, keine nativen Eigenschaften mehr aufweist.

Die Intaktheit einer kollagenen Faser läßt sich durch die Messung der sog. Schrumpfungstemperatur (TS) ermitteln. Die TS ist als die Temperatur definiert, bei der die kollagene Faser beim Erwärmen in wäßrigem

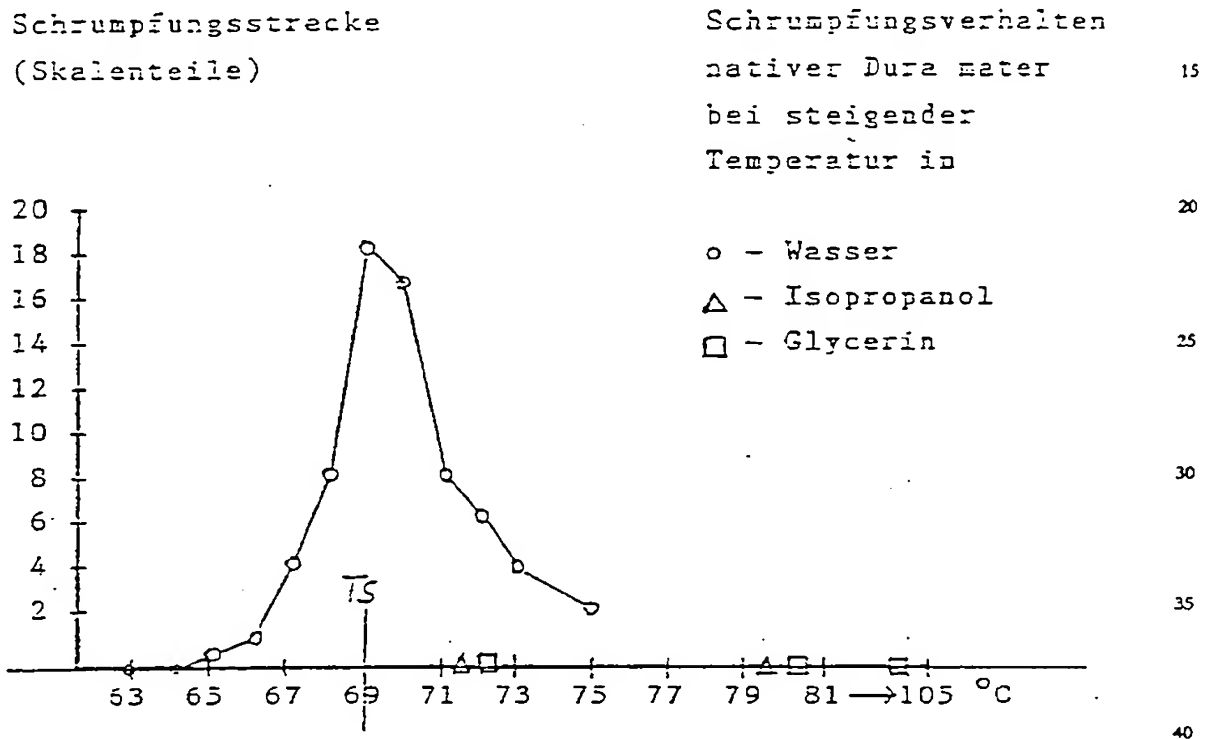
Medium ein Maximum eines Schrumpfungs-Intervalls pro Temperatur-Intervall aufweist.

Beispielsweise zeigt ein Streifen einer nativen Dura mater von 4 mm Breite und 60 mm Länge bei sukzessivem Erwärmen in wäßrigem Medium eine TS von 69°C (Diagramm 1). Dies verdeutlicht aber, daß eine Thermoaktivierung von Dura oder Sehnen oder Knochen bei 69°C oder darüber in wäßrigem Medium sich von selbst verbietet.

Bei sukzessivem Erwärmen von Nativ-Dura auf 80°C in wasserfreiem Medium, z. B. in IPA, findet dagegen keine Schrumpfung statt (Diagramm 1).

Es hat sich überraschenderweise auch gezeigt, daß sich in wasserfreiem Medium sogar Temperaturen von z. B. 105°C anwenden lassen, ohne daß es zu einer Schrumpfung kommt (Diagramm 1).

Diagramm 1



Unterschiedliche Eigenschaften von in wäßrigem bzw. nicht wäßrigem Medium thermisch behandelten Geweben zeigen sich auch bei den Merkmalen Festigkeit und Dehnung. So weisen native 4 mm breite Dura-Streifen von vergleichbarer Dicke folgende relative Zugfestigkeitswerte auf:

thermisch nicht behandelt	100%
20 Min. bei 80°C in einem IPA-Bad behandelt	99%
20 Min. bei 105°C in einem Glycerin-Bad behandelt	96%
20 Min. bei 80°C in einem Wasserbad behandelt	49%

Analog verschlechtert sich das Dehnungsverhalten.

Die Bruchdehnung der nativen, thermisch nicht behandelten und thermisch in einem 80°C warmen IPA-Bad behandelten Dura-Streifen liegt bei etwa 40%, wohingegen sie bei den thermisch 20 Min. bei 80°C in Wasser behandelten Durastreifen bei 150% liegt. Derartig in Festigkeit und Dehnbarkeit verschlechterte Eigenschaften von Transplantat-Geweben sind jedoch für chirurgische Zwecke nicht oder nur mit starker Einschränkung akzeptabel.

Analoges gilt auch für thermisch in wäßrigem Medium behandelte Knochen:

So nimmt die Druckbelastung nach zehnminütigem autoklavieren z. B. bei 121°C in gespanntem Wasserdampf auf Werte von etwa 10–20% der Ausgangswerte ab.

Eine thermische Behandlung in IPA (80°C) bzw. Glycerin (105°C) für 20 Min. ergibt lediglich eine Erniedrigung der Werte auf ca. 97%.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in nachstehend aufgeführten Beispielen dargestellt:

1. Dura mater wird in üblichen Prozeß-Schritten gereinigt und schließlich zum Zwecke der Konservierung gefriergetrocknet. Der Wassergehalt in der Dura beträgt nun ca. 5%. Zur Thermoaktivierung wird ein 4 × 5 cm großes konserviertes Durastück in ein IPA-Bad von 75°C gegeben und 20 Min. darin belassen.

In der so behandelten Dura sind vorhandene HIV inaktiviert und die mechanischen Eigenschaften der Dura weisen gegenüber einer nicht thermobehandelten Dura keine Verschlechterung auf (Zugfestigkeit: minus 1%).

2. Ein nativer Spongiosa-Knochen in der Abmessung 20 × 20 × 20 mm wird in üblichen Prozeß-Schritten gereinigt und schließlich durch Gefriertrocknung konserviert. Der Wassergehalt des Knochens beträgt nun ca. 5%. Zur Thermoinaktivierung wird das konservierte Knochenstück in einem Druckgefäß mit IPA 30 Min. bei 3 bar (ca. 110°C) behandelt.

Im so behandelten Knochen sind vorhandene HIV inaktiviert und die mechanischen Eigenschaften des Knochens weisen gegenüber einem nicht thermobehandelten Knochen praktisch keinen Festigkeitsverlust auf.

3. Ein nativer Hüftknochen wird zum Zwecke der Thermoinaktivierung 60 Min. in einem Glycerin-Bad bei 110°C behandelt.

Im so behandelten Knochen werden vorhandene HIV oder Hepatitis-Viren inaktiviert und die mechanischen Eigenschaften des Knochens weisen bei Druckbelastung gegenüber einem nicht thermobehandelten Knochen keinen wesentlichen Festigkeitsverlust auf.

Anschließend kann der Glycerin-behandelte Hüftknochen durch Tiefkühlen z. B. bei -40°C gelagert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auf biologische Gewebe in allen Herstellungsstufen angewendet werden, z. B. auf Hüftköpfe in nativem Zustand oder auf Knochen-Material (in Würfel- oder Chips-Form), z. B. während des Herstellungsprozesses oder vor, während oder nach der Konservierung. Analoges gilt für anderes biologisches Material aus Knochen- oder Kollagen-Gewebe.

Bedingt durch unterschiedliche Materialtypen und Abmessungen läßt sich im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens durch Modifikationen bei Dauer, Temperatur und Druck gewerblich nutzbares biologisches Ersatzmaterial für die Chirurgie gewinnen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Thermoinaktivierung thermolabiler Viren in kollagenen oder kollagenhaltigen Geweben, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebe in nicht wäßrigen Flüssigkeiten, Dämpfen oder Gasen einer Behandlung bei erhöhter Temperatur, die über der jeweiligen Inaktivierungstemperatur der Viren liegt, ausgesetzt werden unter Beibehaltung ihrer Transplantate-Eigenschaften.

2. Verfahren nach Anspruch 1, daß die nicht wäßrigen Flüssigkeiten, Dämpfe oder Gase einen Wasseranteil bis zu 10% enthalten können.

3. Verfahren nach 1 bis 2, daß die Verfahrenstemperatur zwischen 50°C und 130°C liegt.

4. Verfahren nach 1 bis 3, daß die Temperaturbehandlung bei Unter-, Normal- oder Überdruck oder alternierend erfolgen kann.

5. Verwendung der nach Anspruch 1 bis 4 thermobehandelten Gewebe als Transplantate.